

ФАРМАКОГНОЗИЯ И БОТАНИКА

А. А. Ульянова¹, Н. А. Кузьмичева²

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ БРУСНИКИ И ТОЛОКНЯНКИ МЕТОДОМ ТСХ

¹Витебская областная контрольно-аналитическая лаборатория

²Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

Предложена простая методика идентификации листьев брусники и толокнянки в цельном и измельченном виде с помощью ТСХ на пластинках с силикагелем. После проявления раствором 2,6-дихлорхинон-4-хлоримида в метаноле и выдерживания в парах аммиака фенолгликозиды проявляются в виде пятен синего цвета на розовом фоне, причем у брусники определяются два пятна, соответствующих арбутину и гидрохинону ($R_f = 0,43$ и $R_f = 0,68$ соответственно), а у толокнянки – только одно (соответствующее арбутину), которое иногда сопровождается метиларбутином ($R_f = 0,35$). Примесь листьев ортилии однобокой и грушанки круглолистной можно определить по дополнительным пятнам на ТСХ, расположенным между арбутином и гидрохиноном.

Ключевые слова: брусника, толокнянка, *Vaccinium vitis-idaea*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Ericaceae*, ТСХ.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство вересковые *Ericaceae* Juss. (incl. *Pyrolaceae* Dumort.) представлено в Республике Беларусь 13 родами, отдельные виды которых являются источником лекарственного растительного сырья (ЛРС), другие же следует рассматривать в качестве перспективных лекарственных растений. Так, в Государственную фармакопею Республики Беларусь (ГФ РБ) включены побеги багульника, листья и побеги брусники и толокнянки, плоды и побеги черники [1], разработана фармакопейная статья «Вереска обыкновенного побеги» [2]. В Российской Федерации, кроме того, разработана нормативная документация на сырье и лекарственные средства из голубики, клюквы болотной, вереска обыкновенного, грушанки круглолистной, ортилии однобокой [3]. Ортилия однобокая под названием «Боровая матка» присутствует в аптечной сети Республики Беларусь в виде биологически активной добавки.

Все перечисленные выше виды растений могут выступать примесями по отношению друг к другу, поскольку имеют общий ареал, экологическую приуроченность и схожий состав действующих веществ, содержащихся в разных количествах. Наиболее часто возникает проблема корректной диагностики лекарственного растительного сырья брусники и толок-

нянки как на этапе заготовительных мероприятий, так и при приемочном контроле в цельном (ангро), но особенно в измельченном состоянии. Степень измельчения в готовом продукте при этом значительно усложняет идентификацию сырья и обнаружение в нем примесей. Возникают затруднительные ситуации по установке подлинности таких видов сырья с обращениями потребителей в региональную контрольно-аналитическую службу по месту жительства и на кафедру фармакогнозии фармацевтического факультета ВГМУ.

Микроскопический анализ порошка листьев толокнянки и брусники позволяет идентифицировать их только при наличии определенного опыта и соблюдении специальной методики приготовления микропрепаратов, отличной от методики ГФ РБ. Она включает предварительный просев порошка листьев с выделением фракции с размерами частиц 0,25–0,31 мм и удаление фенольных соединений (в случае листьев толокнянки путем многократной экстракции кипящей водой до обработки 5% щелочью, а в случае листьев брусники, которые плохо смачиваются водой, обработку начинают с кипячения в 5% растворе натрия гидроксида, затем промывают водой и повторяют эти процедуры несколько раз) [4]. Проявляемость диагностически значимых признаков в порошке листьев толокнянки при этом не превышает 34% [5].

Качественная химическая реакция на конденсированные дубильные вещества с 1% спиртовым раствором ванилина и концентрированной кислотой хлористоводородной, принятая в фармакогностическом анализе ряда европейских стран, не позволяет удовлетворительно отличить листья толокнянки от листьев брусники, так как красное окрашивание появляется в обоих случаях и отличается лишь интенсивностью [4].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось усовершенствование существующих методик определения подлинности листьев брусники и толокнянки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на кафедре фармакогнозии УО «Витебский государственный медицинский университет» и в областной контрольно-аналитической лаборатории Витебского УП «Фармация». Были изучены 4 образца лекарственного растительного сырья и 2 образца примесей к нему:

1. Лист брусники с. 0417, производитель ООО «Калина».
2. Лист толокнянки, заготовленный в 2017 г. в окрестностях г. Витебска.
3. Лист брусники, порошок крупный в фильтр-пакетах по 1,5 г № 20, производитель ООО «Калина».
4. Лист толокнянки, порошок крупный в фильтр-пакетах по 2,0 г № 20, производитель ЧАО «Лектравы», Украина. Степень измельчения крупного порошка – проходящие сквозь сито 2000 мкм обоих производителей.
5. Лист ортисии однобокой, заготовленный в 2017 г. в окрестностях г. Витебска.
6. Лист грушанки круглолистной, заготовленный в 2017 г. в окрестностях г. Витебск (рисунок 1, см. обложку журнала).

Для подтверждения подлинности ЛРС проводили макроскопический и микроскопический анализ [4], а также использовали метод тонкослойной хроматографии на пластинках TLC Silicagel 60 F₂₅₄ Merck. Для получения извлечения около 1,0 г измельченного сырья помещали в колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл воды очищенной, нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 40 минут. К горячему извлечению прибавляли 1,0 г основного ацетата свин-

ца, перемешивали и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 7 минут. По 3 мкл полученного центрифугата и раствора стандарта (арбутин Sigma-Aldrich batch BCBK4993V) наносили на пластинки с силикагелем, помещали в камеру с системой растворителей этилацетат-метанол-вода (30:4:3), после прохождения фронтом растворителей 10 см пластинки высушивали, обрабатывали 0,5% раствором 2,6-дихлорхинон-4-хлоримида в метаноле и выдерживали в парах аммиака в течение 2 минут. В качестве стандарта использовали водный раствор арбутина-стандарта в концентрации 500 мкг/мл [6, 7].

Для объективизации полученных данных хроматограммы сканировали (сканер EPSON Perfection 1270 в режиме:RGB, 24 бит, 300dpi), изображение обрабатывали с помощью программы ImageJ ver. 1.41 h. Получали денситограммы в виде графиков, где по оси абсцисс были значения R_f, а по оси ординат – интенсивность окраски пятна. Кроме упрощения анализа полученных хроматограмм, повышения наглядности различий в них, программа ImageJ позволяет дополнительно определить количественное содержание каждого из веществ на хроматограмме по площади полученного на денситограмме пика [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам макроскопического и микроскопического анализа все изученные образцы соответствовали своему наименованию. Проявляемость диагностически значимых признаков у измельченных образцов сырья была значительно ниже, чем у цельного. При проведении качественной реакции окрашивание в красный цвет обнаружено как для порошка листьев толокнянки, так и для порошка листьев брусники. Наиболее ярко-красное окрашивание содержимого паренхимных клеток наблюдали у порошка листьев толокнянки, у листьев брусники окраска наблюдалась менее интенсивно (маскировалась хлорофиллом).

При хроматографии извлечений в системе этилацетат-метанол-вода (30:4:3) после соответствующей обработки фенолгликозиды проявлялись в виде пятен синего цвета на розовом фоне. Общая схема хроматограмм представлена на рисунке 2 (см. обложку журнала).

Основным фенолгликозидом листьев

брусники и толокнянки является арбутин ($R_f = 0,43$). Он составляет от 52% до 88% суммы фенолгликозидов. Вторым важным компонентом суммы фенольных гликозидов листьев брусники является гидрохинон ($R_f = 0,68$), в листьях остальных изученных видов он на ТСХ не определяется. В листьях толокнянки арбутин сопровождается метиларбутином, эти два соединения визуальнo не разделяются на ТСХ при условиях, описанных выше. Однако на денситограмме регистрируется дополнительный пик с $R_f = 0,36$ (рисунок 3).

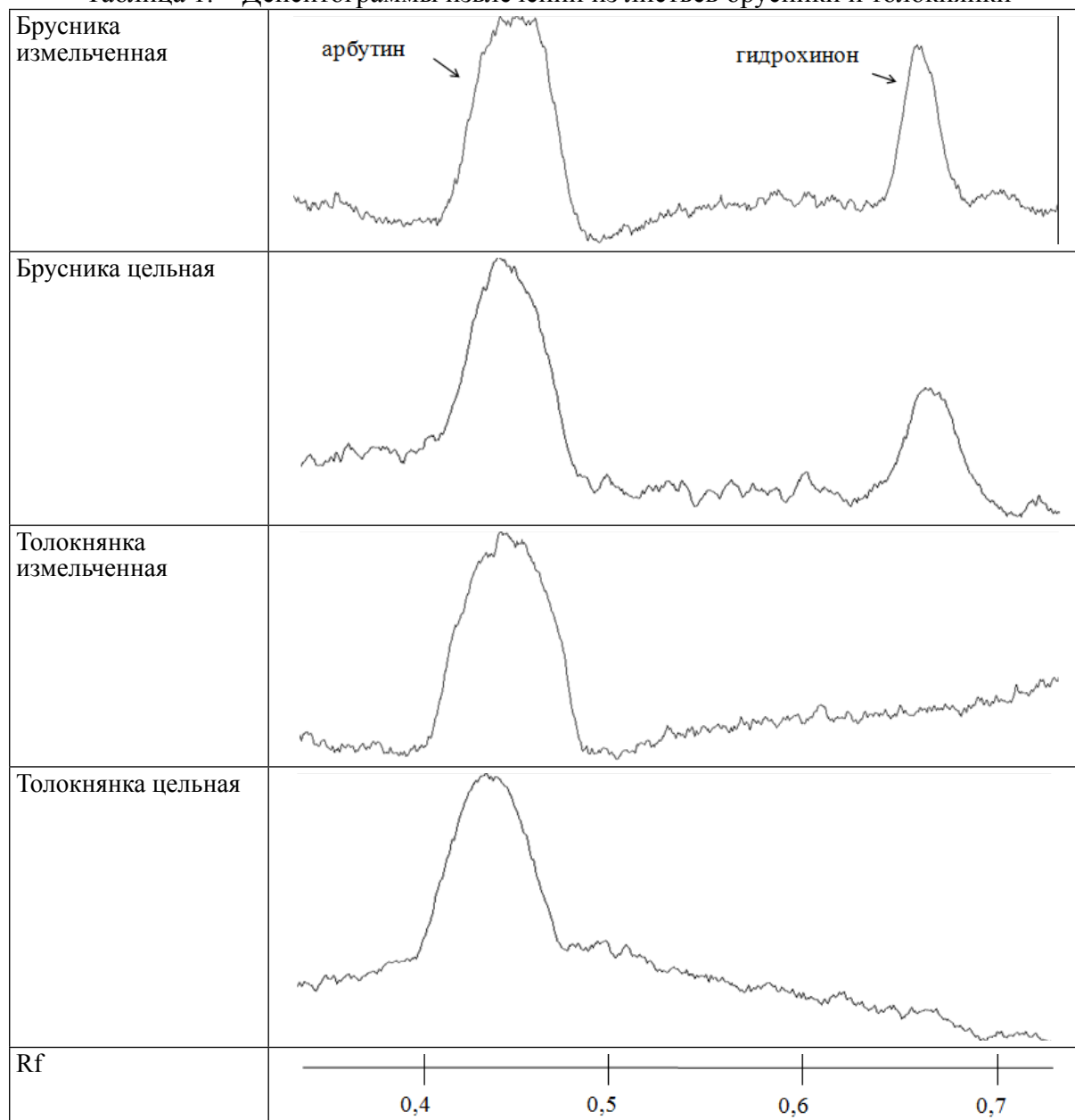
При этом извлечения из цельного и измельченного сырья давали идентичные

результаты. Все денситограммы, полученные после обработки хроматограмм извлечений из листьев брусники и толокнянки, представлены в таблице 1.

Таким образом, листья брусники и толокнянки в измельченном виде легко идентифицируются с помощью ТСХ в вышеприведенных условиях: у брусники дополнительное пятно находится на хроматограмме выше пятна арбутина-стандарта (на уровне гидрохинона-стандарта), а у толокнянки – или отсутствует, или находится ниже арбутина-стандарта.

Извлечение из листьев грушанки круглолистной имеет в своем составе два фенолгликозида, один из которых по хрома-

Таблица 1. – Денситограммы извлечений из листьев брусники и толокнянки



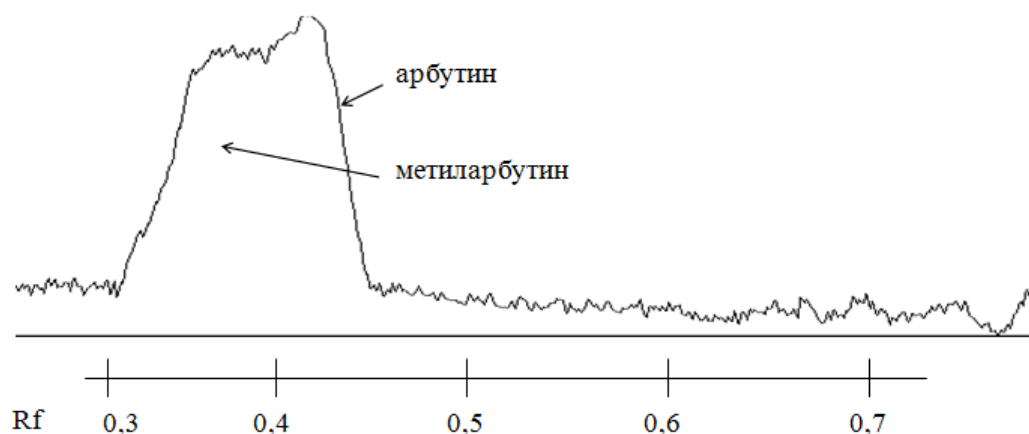


Рисунок 3. – Денситограмма извлечения из листьев толокнянки

тографическому поведению идентичен арбутину, другой имеет $R_f = 0,55$. Фенолгликозиды листьев ортилии однобокой проявляются в виде пятен с $R_f = 0,43$ (арбутин); 0,57 и 0,60 (таблица 2).

Таким образом, грушанка круглолистная и ортилия однобокая отличаются от брусни-

ки и толокнянки дополнительным фенолгликозидом, занимающим на хроматограмме место между стандартами арбутина и гидрохинона. Листья ортилии однобокой по сравнению с грушанкой содержат еще один дополнительный фенолгликозид, проявляющийся в виде пятна синего цвета с $R_f = 0,60$.

Таблица 2. – Денситограммы извлечений из листьев грушанки круглолистной и ортилии однобокой

Лист грушанки круглолистной	
Лист ортилии однобокой	
R_f	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с трудоемкостью микроскопического анализа измельченных листьев брусники и толокнянки и неоднозначной интерпретацией его результатов из-за недостаточной проявляемости диагностически значимых признаков на первое место в идентификации сырья этих двух видов выходит метод тонкослойной хроматографии.

Фенолгликозиды, присутствующие в водных извлечениях из сырья, удовлетворительно разделяются на пластинках с силикагелем в системе растворителей этилацетат-метанол-вода (30:4:3). В качестве проявляющих реактивов предлагается 0,5% раствор 2,6-дихлорхинон-4-хлоримида в метаноле и выдерживание пластинок в парах аммиака в течение 2 минут. Это позволяет уверенно отличать измельченные

листья брусники от листьев толокнянки, а также выявлять примесь к ним листьев ортилии однобокой и грушанки круглолистной по составу фенолгликозидов. На ТСХ извлечений из листьев толокнянки присутствует, как правило, одно пятно синего цвета с $R_f = 0,43$, соответствующее арбутину. В извлечениях из листьев брусники оно сопровождается гидрохиноном ($R_f = 0,68$), а при наличии примесей грушанки и ортилии на хроматограммах регистрируются дополнительные пятна фенолгликозидов в диапазоне $R_f = 0,53$ – $0,60$.

SUMMARY

A. A. Ulyanova, N. A. Kuzmichova
IDENTIFICATION OF THE MEDICINAL
PLANT RAW MATERIAL FROM
LINGONBERRY AND BEARBERRY
WITH TLC METHOD

A simple procedure of lingonberry and bearberry leaves identification in a whole or crushed form using TLC analysis on plates with silica gel has been proposed. After development by the solution of 2,6-dichloroquinone-4-chlorimide in methanol and holding in ammonia vapor phenol glycosides develop as blue spots against pink background, and there are two spots distinguished in lingonberry corresponding to arbutin and hydroquinone ($R_f = 0,43$ and $R_f = 0,68$ respectively). But there is only one for bearberry (corresponding to arbutin) which is sometimes accompanied by methylarbutin ($R_f = 0,35$). An admixture of *Orthilia secunda* and *Pyrola rotundifolia* can be distinguished by additional spots on TLC placed between arbutin and hydroquinone.

Keywords: lingonberry, bearberry, *Vaccinium vitis-idaea*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Ericaceae*, thin layer chromatography (TLC).

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 3 т., Т. 2. Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья / Министерство здравоохранения Республики Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред.

А. А. Шерякова. – Молодечно: Типография «Победа», 2009. – 1368 с.

2. Вереска обыкновенного побегов / Новости экспертизы и регистрации. – 2018. – №1 (157). – С. 58–61.

3. Неофициальные виды семейства вересковых как перспективные акваретики и уроантисептики / Н. С. Фурса [и др.] // Вестник фармации. – 2016. – №3. – С. 59–66.

4. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие: в 3-х томах / И. А. Самылина [и др.] – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – Т. 3. – С. 193–197.

5. Потанина, О. Г. Исследование проявляемости диагностически значимых признаков в стандартном и нестандартном лекарственном растительном сырье / О. Г. Потанина // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке», 2003. – М., 2003. – С. 506.

6. Кузьмичева, Н. А. Сезонная динамика накопления фенольных соединений в траве ортилии однобокой / Н. А. Кузьмичева // Вестник фармации. – 2012. – № 3. – С. 14–22.

7. Кузьмичева, Н. А. Фармакогностический анализ травы грушанок / Н. А. Кузьмичева // Вестник фармации. – 2014. – № 2. – С. 26–32.

8. Иванкова, М. Н. Количественное определение арбутина в листьях брусники видеоденситометрическим методом и методом ВЭЖХ / М. Н. Иванкова // Достижения фундаментальной медицины и фармации. Материалы 67-ой научной сессии сотрудников университета. 2–3 февраля 2012 г. – Витебск: ВГМУ, 2012. – С. 276.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет»,
кафедра фармакогнозии
с курсом ФПК и ПК,
тел. раб.: 8 (0212) 64-81-78,
Кузьмичева Н. А.

Поступила 04.07.2018 г.

Рисунки к статье А. А. Ульяновой, Н. А. Кузьмичевой
 «Идентификация лекарственного растительного сырья
 брусники и толокнянки методом ТСХ» (С. 28-32)

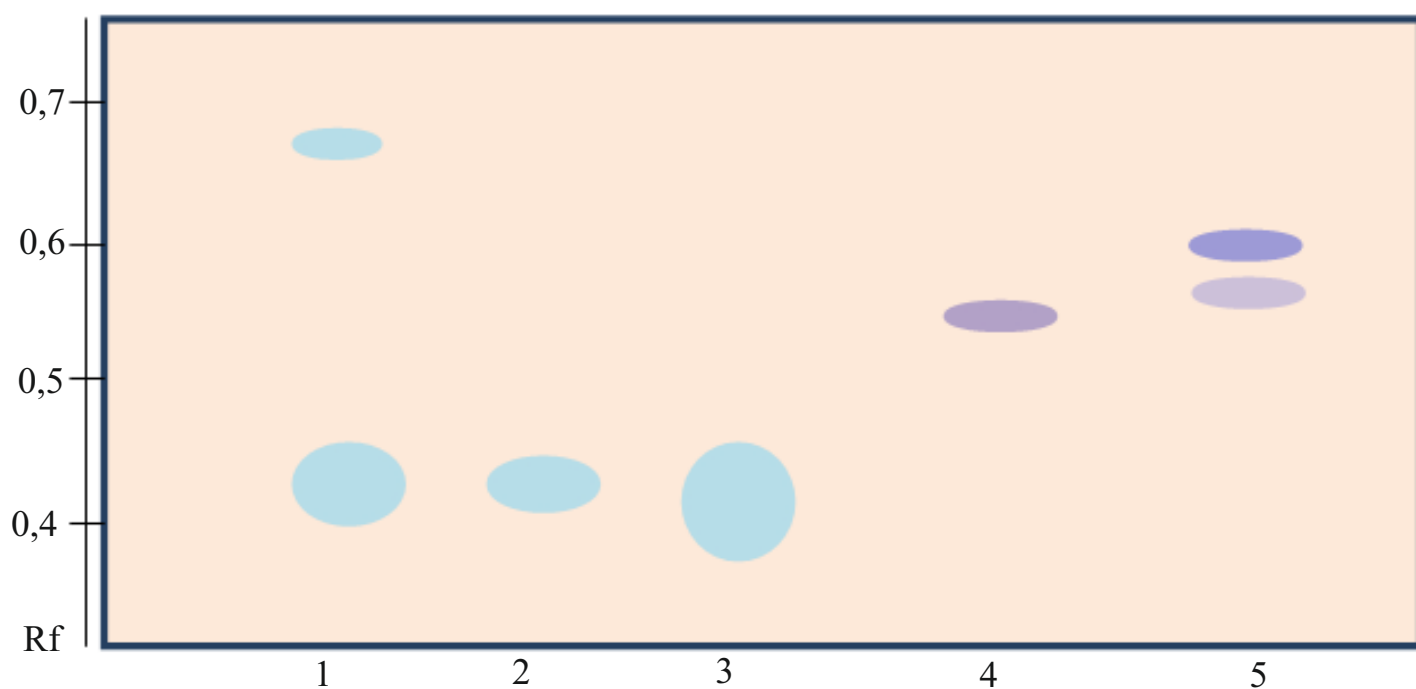


а



б

Рисунок 1. – Грушанка круглолистная (а) и ортилия однобокая (б)



1 – брусника; 2 – арбутин – стандарт; 3 – толокнянка; 4 – грушанка; 5 – ортилия
 Рисунок 2. – Схема ТСХ извлечений из анализируемых листьев